

比较基因组学揭示鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 在种内的基因组差异

徐瑞波^{1,2,3}, 刘旭^{1,2,3}, 李伟程^{1,2,3}, 沈馨^{1,2,3}, 张和平^{1,2,3*}
¹ 内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018
² 内蒙古农业大学 农业农村部奶制品加工重点实验室 呼和浩特 010018
³ 内蒙古农业大学 内蒙古乳业生物技术与工程重点实验室 呼和浩特 010018)

摘要 鼠李糖乳杆菌是人和动物肠道的共生菌,在食品、医药和动物养殖等多个领域均有应用。本文以鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 全基因组为对象,结合 NCBI 公开的 214 株鼠李糖乳杆菌基因组序列进行比较基因组学分析,解析不同鼠李糖乳杆菌基因组差异。结果发现,215 株鼠李糖乳杆菌共识别到 16 915 个泛基因,247 个核心基因;后续通过 247 个核心基因构建系统发育树,分离源和分离地不存在明显聚类趋势。鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 处在分支最大的分支 II 中,该分支各菌株之间的遗传关系近,差异很小,区分难度大;对分支 II 中 98 株鼠李糖乳杆菌进行 RAST 注释分析,鼠李糖乳杆菌虽在功能方面整体存在高度相似性,但其中部分菌株与鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 存在一定差异,相较于其它鼠李糖乳杆菌,鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 具有更强的自身代谢、转录、运输等方面的调控能力,并且含有与益生功能相关的基因,如谷胱甘肽(*gshAB*)、胞外多糖(*rmlA-rmlD*、*epsH*)及提高宿主代谢能力(*tagE*)相关基因。通过比较基因组学揭示鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 在种内的基因组差异,为鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 的开发及应用奠定了基础。

关键词 鼠李糖乳杆菌 Probio-M9; 鼠李糖乳杆菌; 比较基因组学

文章编号 1009-7848(2023)02-0254-11 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2023.02.025

鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)是厚壁菌门乳杆菌科的一种革兰氏阳性杆状细菌。鼠李糖乳杆菌广泛存在于婴儿粪便样本以及人类母乳中^[1],这些细菌通常对消化道中的条件具有耐受性(即低 pH 值、胆盐、厌氧条件)^[2]。国内外大量研究发现,鼠李糖乳杆菌具有调节肠道菌群^[3],调节肠道免疫^[4-7],抗氧化^[8]、抑制生物毒素^[9],抑制致病菌^[10-11]和调控脂肪细胞分化^[12]等功能。据报道,在新生儿中使用某些鼠李糖乳杆菌菌株,特别是鼠李糖乳杆菌 GG,可促进早产和低出生体重新生儿的生长^[13-14]。

前期研究^[15]从 40 份人初乳样品中分离出有活性的益生菌菌株——鼠李糖乳杆菌 Probio-M9,该菌株在人工胃肠液中消化 11 h 后的存活率为 78.33%,在中国具有自主知识产权,推测更适合中国人和其他亚洲人,因此本文对该菌株做后续安全性评估、动物实验和全基因组测序等研究具有

参考价值。

比较基因组学是从基因水平比较不同物种的基因组序列,从而了解其基因的功能、表达机制及物种进化的学科^[16]。Sun 等^[17]通过比较基因组学对 213 株乳杆菌属进行分析,系统解析了乳杆菌属不同谱系的遗传进化历程,发现所有的乳杆菌都是由一个共同的祖先进化而来的。Yu 等^[18]通过核心基因比对分析乳酸乳球菌、植物乳球菌等若干乳球菌属的核心基因,解析乳球菌属内的遗传进化关系,发现乳球菌属在基因组大小,基因含量和碳水化合物代谢方面具有高度多样性。孙靛^[19]通过比较基因组学分析两株鼠李糖乳杆菌,结果发现鼠李糖乳杆菌基因组层面的断裂基因和转录组层面的丙酮酸代谢途径上表达的差异,可能是鼠李糖乳杆菌高产 L-乳酸的原因。比较基因组学能有效分析、挖掘和利用微生物基因组各个层面信息,能够准确且快速地研究菌种的同源基因以及特有功能。

目前对来源于母乳的菌株研究较少。特别是在中国,关于从人乳中分离得到的鼠李糖乳杆菌的研究报道更少,而关于母乳分离株鼠李糖乳杆菌的比较基因组研究更是少之又少。本研究将以

收稿日期: 2022-02-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31720103911);内蒙古科技重大专项(ZDZX2018018)

第一作者: 徐瑞波,女,博士生

通信作者: 张和平 E-mail: hepingdd@vip.sina

母乳分离株鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 结合 NCBI Refseq 数据库下载的 214 株鼠李糖乳杆菌基因组序列为研究对象,通过比较基因组学解析不同菌株基因特征及种内基因差异,了解其遗传进化机制,为鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 由内蒙古农业大学乳酸菌菌种资源库(Lactic acid bacteria collection center, LABCC)提供。

1.2 鼠李糖乳杆菌基因组序列

截止 2021 年 4 月 17 日,已将 NCBI(National Coalition Building Institute, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)Refseq 数据库中 214 株鼠李糖乳杆菌基因序列以及一株暂未公开的鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 全部下载完成。

1.3 菌株培养与基因组 DNA 的提取、测序

菌株鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 的培养具体操作步骤如下:将该菌接种到 37 °C 的 MRS 液体培养基中,无氧条件培养 24 h 后进行传代,最后使用 PBS 缓冲液将 3 代菌泥中废弃培养基去除,然后进行全基因组 DNA 的提取。全基因组 DNA 提取方法参考钟智等^[20]的方法。将提取的 DNA 通过 1%琼脂糖凝胶电泳进行完整度和纯度检测,将符合要求的高质量 DNA 按照 PacBio SMRT 全基因组 DNA 建库流程建立 10 kb 文库,建库后根据 PacBio SMRT RS II 测序平台上机流程进行全基因组测序。

1.4 基因组测序和组装

将测序所得原始数据进行质量评估^[21],去掉低质量测序序列和接头,使用 RS_HGAP_Assembly.3 软件对鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 序列进行质控和基因组组装,并使用 Circlator(V1.5.5)^[22]软件对 3 代数据进行环化,最后获得 Probio-M9 的全基因序列。

1.5 比较基因组分析

1.5.1 泛-核心基因集构建 利用 Prokka^[23]软件对菌株基因组进行基因预测后,采用 Roary^[24]软件对核心基因集、泛基因集进行识别。

1.5.2 系统发育树构建 使用经 Roary 软件分析得到的核心基因序列,通过 TreeBest 软件(<http://www.mybiosoftware.com/treebest>)构建邻接系统发育树(Neighbor-Joining, NJ)。使用 iTol 在线软件对系统发育树进行可视化([http:// itool.embl.de/](http://itool.embl.de/))^[25]。

1.5.3 平均核苷酸一致性(Average nucleotide identity, ANI)计算 本研究参考 Jain 等^[26]报道的 fastANI(<https://github.com/ParBLiSS/FastANI>)计算 215 株鼠李糖乳杆菌的菌株间 ANI 值。利用 TBtools^[7]软件绘制 ANI 聚类热图。

1.5.4 全基因组圈图和功能基因组分析 将 215 株鼠李糖乳杆菌核酸序列文件分别上传至 RAST (Repaid Annotation using Subsystem Technology, <http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>)进行注释,并下载对应的基因功能注释文件。将鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 的功能基因注释文件上传至 CGView Server (http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/)进行圈图绘制。

1.5.5 碳水化合物活性酶 将组装完成的鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 全基因组序列上传至在线注释 dbCAN 平台中(<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/>)进行注释,下载其注释文件。统计鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 基因组信息。

2 结果和分析

2.1 鼠李糖乳杆菌基因组基本信息

对样品鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 测序数据进行评估组装后,拼接成完整的基因组圈图(图 1),并统计鼠李糖乳杆菌所有菌株的基因组信息。鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 组装后,基因组大小为 2 987 632 bp,GC 含量为 46.76%,包含 2 934 个蛋白质编码区(Coding sequence, CDS)、60 个 tRNA、75 个 RNA。215 株鼠李糖乳杆菌基因组大小(2.97±0.11)Mbp,GC 含量为(46.68±0.016)%,CDS 为(2 671±130)个。

2.2 泛-核心基因集构建

一个物种泛基因组主要由核心基因组、非必须基因组以及特有基因组 3 部分组成^[28]。215 株鼠李糖乳杆菌共识别到 16 915 个泛基因,247 个核心基因,并且 215 株鼠李糖乳杆菌核心基因占平

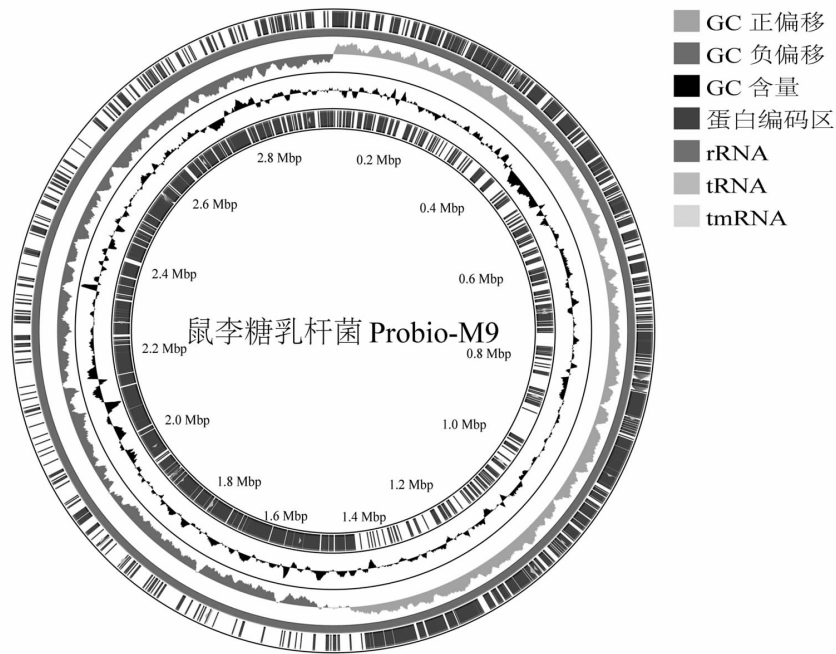


图 1 鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 全基因组圈图

Fig.1 The whole genome circle-map of *L. rhamnosus* Probio-M9

均 CDS 为 9.2%,揭示鼠李糖乳杆菌存在一个较大的泛基因组,但是拥有一个较小的核心基因组。鼠李糖乳杆菌的泛-核心基因统计结果如图 2 所示,核心基因随着基因组的增加整体呈现一个先下降

后趋于稳定的状态而泛基因组大小整体呈现上升趋势,表明鼠李糖乳杆菌的泛基因组尚且处于一个相对开放的状态,与 Kant 等^[29]的研究结果基本一致。

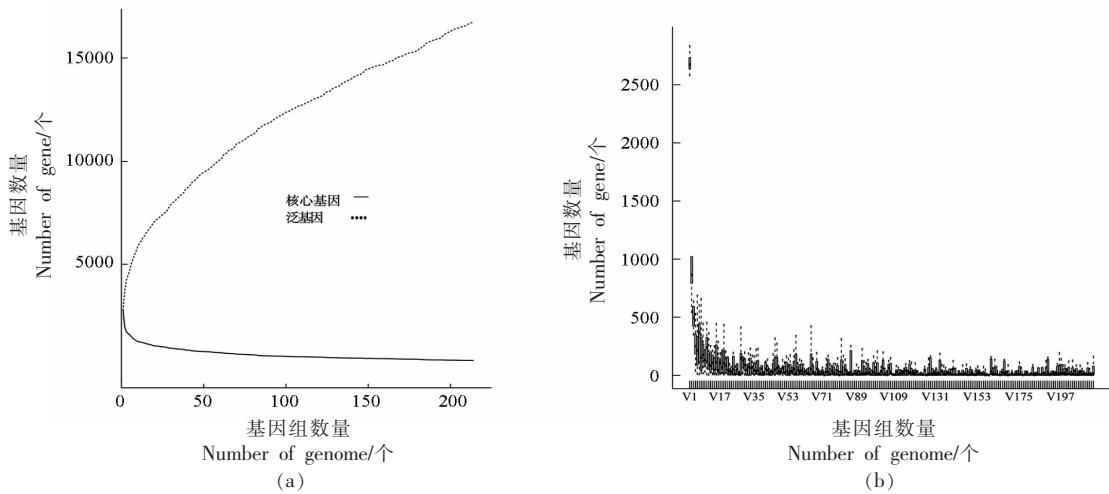


图 2 泛-核心基因集变化(a)和新基因集变化(b)趋势图

Fig.2 The trend chart of the size of pan-core genes (a) and new genes (b)

2.3 核心基因构建系统发育树

系统发育树可直观反映菌株间群体结构和遗传进化关系。为了研究鼠李糖乳杆菌种内遗传进化关系,本研究基于 215 株鼠李糖乳杆菌(包含模

式菌株鼠李糖乳杆菌 DSM20021^T=鼠李糖乳杆菌 NBRC3425^T=鼠李糖乳杆菌 JCM1136^T、鼠李糖乳杆菌 NRRL B-442^T),采用邻接法,基于 247 个核心基因通过 1 000 次的引导迭代,构建系统发育树。

由图 3 可知,215 株乳酸菌主要分为 7 大分支,分别命名为分支 I、分支 II、分支 III、分支 IV、分支 V、分支 VI 和分支 VII。由图可知,分支 II 是该树最大的分支且鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 和模式

菌株均在该分支中,并且该分支各菌株之间的遗传关系近、差异很小、区分难度大。同时根据系统发育树外圈注释发现,鼠李糖乳杆菌的遗传关系与分离源和分离地相关性不明显。

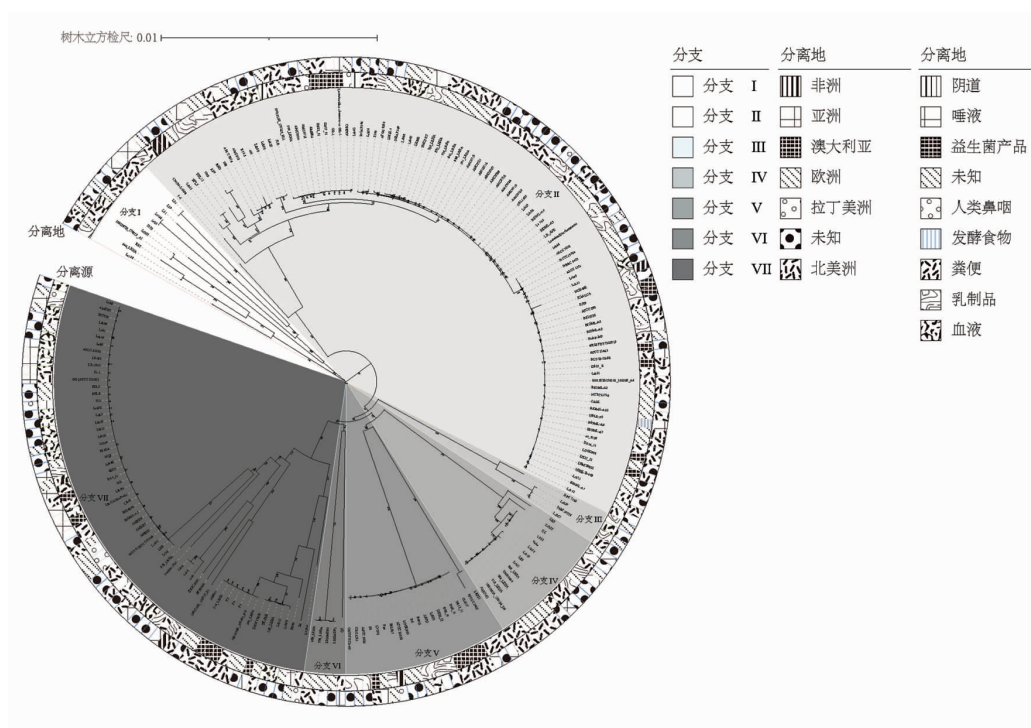


图 3 基于核心基因的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on core genes

2.4 ANI 分析

ANI 是通过比对基因组的同源序列以鉴定菌株亲缘关系^[30]。在比较基因组学分析过程中,ANI 可用于评估基因组间多态性的程度,也可基于基因组序列进行物种鉴别,一般认为 ANI 值大于 95% 即为同一物种^[31]。2018 年 Ciuffo 等^[32]将 95% 的阈值改为 96%,并以此作为物种边界。

为解析鼠李糖乳杆菌遗传多样性,本研究对 215 株鼠李糖乳杆菌进行两两之间 ANI 计算,并构建聚类热图,结果如图 4 所示,全部菌株之间 ANI 值均大于 96.38%,鼠李糖乳杆菌菌株之间具有较高的总体序列同一性 (>96%),这与 Nissila 等^[33]和 Arnold 等^[34]的研究结果一致,提示鼠李糖乳杆菌种内的相似度较高。

2.5 基因组预测与注释

由于分支 II 是系统发育树最大分支且鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 和模式菌株均在该分支中,因

此利用 RAST 在线工具对分支 II 中 98 株鼠李糖乳杆菌菌株进行 RAST 注释,结果如图 5 所示。在鼠李糖乳杆菌基因组中注释到碳水化合物代谢 (Carbohydrates)、蛋白质代谢 (Protein metabolism)、氨基酸及其衍生物 (Amino acids and derivatives)、细胞壁和被膜 (Cell wall and capsule)、DNA 代谢 (DNA metabolism)、RNA 代谢 (RNA metabolism) 和应激反应 (Stress response) 等,共计 26 个功能类别。其中占比最大的是“碳水化合物代谢”,其次是“蛋白质代谢”和“氨基酸及其衍生物”。根据 RAST 注释发现菌株 Lrh44、CRL1505、*Lactobacillus rhamnosus*、KF7、BIOML-A4、Lrh26、Lrh25、AMC010、1019 在硫代谢方面要显著高于鼠李糖乳杆菌 Probio-M9,而其它菌株与鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 呈现一种高度相似,从 RAST 注释无法找到差异。

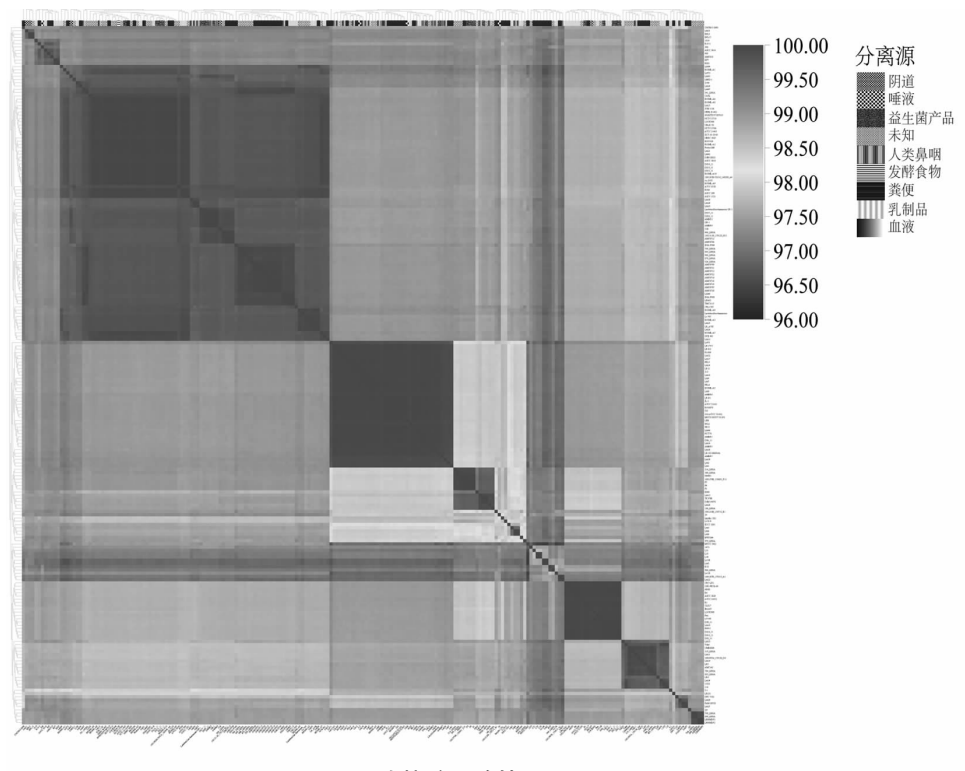


图4 平均核酸一致性
Fig.4 Average nucleotide identity

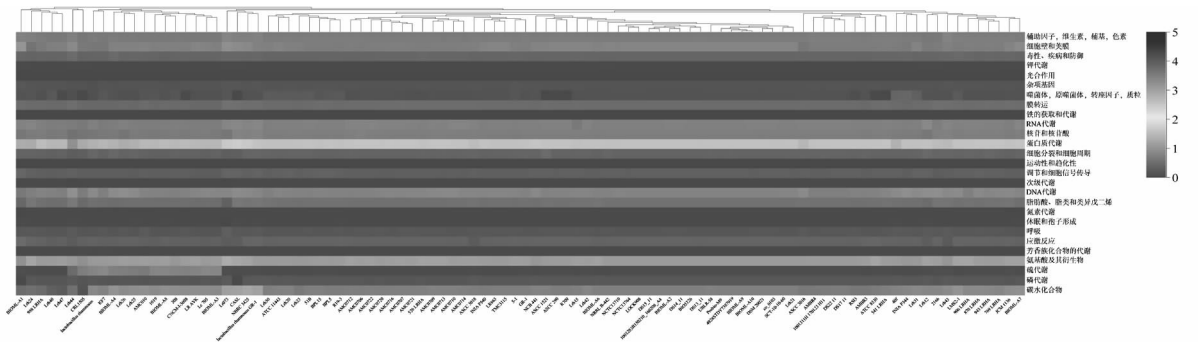


图5 RAST 注释
Fig.5 RAST annotation

2.6 基因组圈图和功能基因组分析

本文以 RAST 注释中与鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 差异明显的 3 株菌和一株模式菌株鼠李糖乳杆菌 DSM20021^T 为研究对象,通过 BRIG 软件进行分析,结果如图 6 所示,参考菌株鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 与模式菌株鼠李糖乳杆菌 DSM20021^T 匹配度最高为 100%,最低为 63.31%。约有 344 bp 和 293 bp 基因组片段匹配度大于等于 90%,占总片段长度的 22.21%;分析发现 477

bp 和 613 bp 基因片段匹配度小于 70%,约占总片段的 3.08%。鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 注释到 12 个特有基因(见表 1),主要负责自身代谢、转录、运输等方面的调控。图中白色部分是核苷酸同一性小于 50%的区域,主要包括编码应激蛋白、生物合成相关蛋白、假定蛋白和噬菌体相关蛋白等多种蛋白质的基因,而这些蛋白质小范围的插入与缺失可以使菌株基因组结构多样化^[35-37]。

表 1 鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 特有基因
Table 1 *L.rhannosus* Probio-M9 specific gene

基因名称	功能注释
<i>yvoA</i>	转录抑制因子
<i>rsmC</i>	核糖体 RNA 小亚基甲基转移酶
<i>yjID</i>	NADH 脱氢酶样蛋白
<i>dkgB</i>	2,5-二酮-d-葡萄糖酸还原酶
<i>patA</i>	假定 <i>n</i> -乙酰-11-二氨基丙二酸转氨酶
<i>tagE</i>	假定的聚(甘油-磷酸)-葡萄糖转移酶
<i>lagD</i>	乳酸球菌-g 加工和运输 ATP 结合蛋白
<i>lenD</i>	乳球菌蛋白 A 分泌蛋白
group_125	假定的转座酶
group_1420	b 型结构域蛋白
group_6037	RNA 聚合酶因子西格玛 70
group_114	螺旋-turn-螺旋结构域蛋白

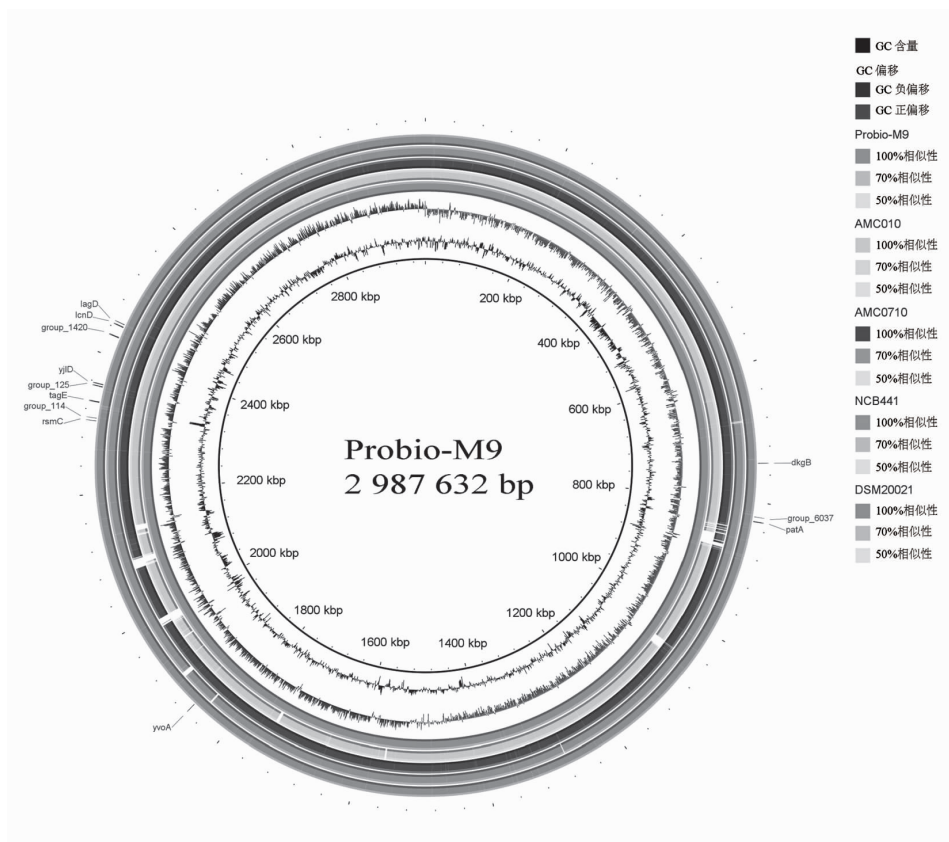


图 6 以鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 为参考基因组的 Brig 分析

Fig.6 Brig analysis based on *L. rhamnosus* Probio-M9 as reference genome

同时又选取了 2 株益生菌明星菌株鼠李糖乳杆菌 GG、鼠李糖乳杆菌 HN001 和一株模式菌株鼠李糖乳杆菌 DSM20021 与鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 进行 BRIG 分析(如图 7),结果如表 2 所示,鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 相较于市面上的益

生菌明星菌株编码更多的关于水解、还原相关酶类,同时还发现鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 编码一个特别的基因(*xly*),与黄原胶裂解酶相关^[38],黄原胶裂解酶是一种黄原胶修饰酶,对黄原胶的改性及新型黄原胶寡糖的制备具有十分重要的意义。

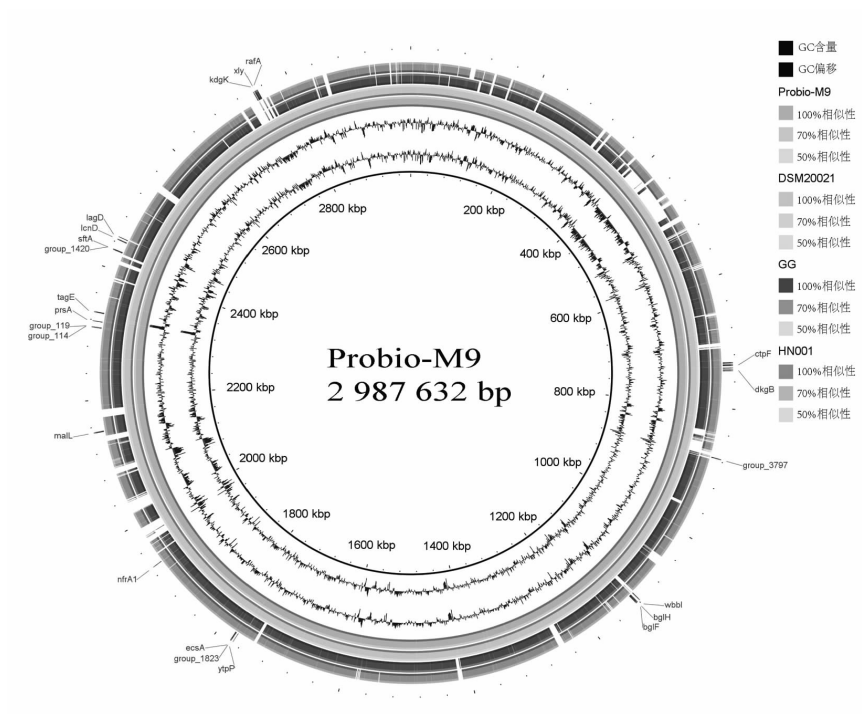


图 7 以鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 为参考基因组的全基因组圈图

Fig.7 Genome-wide cycle map with the reference genome of *L. rhamnosus* Probio-M9

表 2 以鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 为参考基因组的功能基因组分析

Table 2 Functional genome analysis using *L. rhamnosus* Probio-M9 as a reference genome

基因名称	功能注释
<i>malL</i>	寡核苷酸-1-6-葡萄糖苷酶
<i>nfrA1</i>	FMN 还原酶
<i>xly</i>	黄原胶裂解酶前体
<i>bglF</i>	PTS 系统 β -葡萄糖苷特异性 EIIBC A 组分
<i>kdgK</i>	2 脱氢 3 脱氧葡萄糖酸激酶
group_3970	α / β 水解酶家族蛋白
<i>dkgB</i>	2,5-二酮-d-葡萄糖酸还原酶
<i>ecsA</i>	ABC 型转运蛋白 ATP 结合蛋白
<i>ytpP</i>	硫氧还蛋白样蛋白
group_1823	细菌 ABC 转运蛋白
<i>nhaS3</i>	高亲和 Na(+)/H(+)反转运体
<i>rafA</i>	α -半乳糖苷酶
group_1420	B 型结构域蛋白
<i>sftA</i>	DNA 转位酶
<i>pepF1</i>	寡肽酶, 质粒
<i>ctpF</i>	假定的阳离子转运 ATP 酶
<i>bglH</i>	假定的聚(甘油-磷酸)-葡萄糖转移酶
<i>tagE</i>	螺旋-turn-螺旋结构域蛋白
group_114	螺旋转螺旋结构域蛋白
<i>wbbI</i>	B-1-6-半乳糖吡喃糖基转移酶
group_3797	糖基水解酶家族 25
<i>lcnD</i>	乳球菌蛋白 A 分泌蛋白
<i>prsA</i>	折叠酶蛋白前体
group_119	假定的转座酶 DNA 结合结构域蛋白
<i>lagD</i>	乳酸球菌-g 加工和运输 ATP 结合蛋白

2.7 益生特性相关基因分析

本研究基于 Roary 软件注释到鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 含有与益生特性相关的基因,具体信息见表 3。鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 含有谷胱甘肽合成(*gshAB*)、分泌胞外多糖(*rmlA~rmlD*、*epsH*)及核黄素合成(*ribF*)相关基因,同时含有耐酸基因(*clpP*)。研究表明^[39],谷胱甘肽是细胞内调节代谢的重要物质,并且常参与肠黏膜的抗氧化机制,保护肠道免受组织损伤,提高有益菌株在胃肠道中

的存活率。鼠李糖乳杆菌 EPS 具有益生元、调节机体免疫功能、抗氧化效应、抑制动物脂肪生成和吸收重金属等生理功能^[40-43]。本研究还发现,鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 存在提高宿主代谢能力(*tagE*)和产乳酸(*ldh*)相关的基因,可提高菌株益生特性。本研究利用比较基因组学从基因水平揭示了鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 具有多个益生特性相关基因,认为其是一株具有潜在益生功能的菌株。

表 3 鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 具有的益生特性相关基因

Table 3 Genes related to probiotic properties of *L. rhamnosus* Probio-M9

基因名称	功能注释	益生特性
<i>ldh</i>	L-乳酸脱氢酶	糖酵解过程
<i>atpC</i>	ATP 合酶链	黏附分子的产生
<i>tagE</i>	假定的聚(甘油-磷酸)-葡萄糖转移酶	改善宿主代谢
<i>gshAB</i>	谷胱甘肽生物合成双功能蛋白	谷胱甘肽的生物合成
<i>ribF</i>	核黄素生物合成蛋白	核黄素合酶
<i>clpP</i>	ATP 依赖性 Clp 蛋白酶的蛋白水解亚基	应激反应
<i>rmlD</i>	DTDP 4 脱氢鼠李糖还原酶	胞外多糖生物合成工艺
<i>rmlB</i>	DTDP 葡萄糖 42C6 脱水酶	胞外多糖生物合成工艺
<i>rmlC</i>	DTDP 4 脱氢鼠李糖 32C5 差向异构酶	碳水化合物代谢,脂多糖生物合成
<i>rmlA</i>	葡萄糖-1-磷酸胸腺苷转移酶	脂多糖生物合成
<i>epsH</i>	假定的糖基转移酶	转移酶的活动

3 结论

本研究以鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 为例,结合 NCBI 数据库 214 株鼠李糖乳杆菌基因组序列进行比较基因组学研究。215 株鼠李糖乳杆菌通过 247 个核心基因构建系统发育树发现分离源和分离地不存在明显聚类趋势。鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 处在分支最大的分支 II 中,该分支各菌株之间的遗传关系近、差异很小、区分难度大。然后对分支 II 中 98 株鼠李糖乳杆菌进行 RAST 注释分析发现,鼠李糖乳杆菌虽在功能方面整体存在高度的相似性,但其中部分菌株与鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 依然存在着一定差异,鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 相较于其它鼠李糖乳杆菌有着关于自身代谢、转录、运输等方面更强的调控能力并且含有与益生功能相关的基因,如谷胱甘肽(*gshAB*)、胞外多糖(*rmlA~rmlD*、*epsH*)及提高宿主代谢能力(*tagE*)相关基因。本文通过比较基因组学分析发

现鼠李糖乳杆菌的序列与功能有着高度的相似性,并且鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 存在益生功能相关的基因,为后续鼠李糖乳杆菌 Probio-M9 基因组研究及其益生功能开发奠定遗传学基础。

参 考 文 献

- [1] NAM S O, JAE J Y, LEE Y, et al. Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces[J]. PLoS One, 2018, 13(2): 1-15.
- [2] MUHAMMAD S R R, HAFIZA M M, MUHAMMAD S, et al. Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk[J]. LWT, 2017, 84(12): 271-280.
- [3] ALANDER M, SATOKARI R, KORPELA R, et al. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG,

- after oral consumption[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(1): 351–354.
- [4] BERNI C R, NOCERINO R, TERRIN G, et al. Effect of *Lactobacillus* GG on tolerance acquisition in infants with cow's milk allergy: A randomized trial[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2012, 129(2): 580–582.
- [5] INTURRI R, STIVALA A, BLANDINO G. Microbiological characteristics of the probiotic strains *B. longum* BB536 and *L.rhamnosus* HN001 used in combination[J]. Minerva Gastroenterol Dietol, 2015, 61(4): 191–197.
- [6] NERMES M, KANTELE J M, ATOSUO T J, et al. Interaction of orally administered *Lactobacillus rhamnosus* GG with skin and gut microbiota and humoral immunity in infants with atopic dermatitis[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2011, 41(3): 370–377.
- [7] HOLOWACZ S, BLONDEAU C, GUINOBERT I, et al. *Lactobacillus salivarius* LA307 and *Lactobacillus rhamnosus* LA305 attenuate skin inflammation in mice[J]. Beneficial Microbes, 2018, 9(2): 299–309.
- [8] ESCAMILLA J, LANE M A, MAITIN V. Cell-free supernatants from probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer cell invasion *in vitro*[J]. Nutrition and Cancer, 2012, 64(6): 871–878.
- [9] KANKAANPÄÄP T E, EL-NEZAMI H. Binding of aflatoxin B₁ alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 model[J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(3): 412–414.
- [10] NÄSE L, HATAKKA K, SAVILAHTI E, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children[J]. Caries Research, 2001, 35(6): 412–420.
- [11] HE X L, ZENG Q, PUTHIYAKUNNON S, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant enhance neonatal resistance to systemic *Escherichia coli* K1 infection by accelerating development of intestinal defense[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 43305–43318.
- [12] ZHANG Z, ZHOU Z G, LI Y, et al. Isolated exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* GG alleviated adipogenesis mediated by TLR2 in mice[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 368–374 .
- [13] MANZONI P, LISTA G, GALLO E, et al. Routine probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG administration in preterm very-low-birth-weight neonates: A retrospective, 6-year cohort study from two large tertiary NICUs in Italy[J]. Early Human Development, 2009, 85(10): 594–565.
- [14] SKÓRKA A, PIEŚCIK-LECH M, KOŁODZIEJ M, et al. To add or not to add probiotics to infant formulae? An updated systematic review[J]. Beneficial Microbes, 2017, 8(5): 717–725.
- [15] Liu W J, CHEN M X, DUO L. Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human colostrum[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(9): 17602–17615.
- [16] KALINOWSKI J, BATHE B, BARTELS D, et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of *L*-aspartate-derived amino acids and vitamins[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 104 (1/3): 5–25.
- [17] SUN Z H, HARRIS H M B, MCCANN A, et al. Expanding the biotechnology potential of *Lactobacilli* through comparative genomics of 213 strains and associated genera[J]. Nature Communications, 2015, 29(6): 8322–8331.
- [18] YU J, SONG Y Q, REN Y, et al. Genome-level comparisons provide insight into the phylogeny and metabolic diversity of species within the genus *Lactococcus*[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(3): 213–248.
- [19] 孙靛. 鼠李糖乳杆菌利用木薯淀粉发酵产乳酸工艺及组学研究[D]. 南宁: 广西大学, 2018.
SUN L. Study on *L*-lactic acid production from cassavausing *Lactobacillus rhamnosus* with genomics and transcriptomics analysis [D]. Nanning: Guangxi University, 2018.
- [20] 钟智, 孙天松, 陈永福. 基因组分析揭示 *Streptococcus thermophilus* ND-07 富产胞外多糖分子机制 [J]. 中国乳品工业, 2018, 46(4): 9–11, 21.
ZHONG Z, SUN T S, CHEN Y F. Genomic insight into the high exopolysaccharides-producing bacterium *Streptococcus thermophilus* ND-07[J]. Dairy Industry, 2018, 46(4): 9–11, 21.
- [21] 刘文君, 吕瑞瑞, 李伟程, 等. 基于比较基因组学揭示不同植物乳杆菌的遗传特征及菌株差异——以

- Lactobacillus plantarum* P9 和 Lp-6 研究为例[J]. 微生物学报, 2021, 61(8): 2370-2381.
- LIU W J, LÜ R R, LI W C, et al. Comparative genomics revealed genetic characteristics of different *Lactobacillus plantarum* strains: Using P9 and Lp-6 strains as examples[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(8): 2730-2381.
- [22] MARTIN H, NISHADI D S, THOMAS D O, et al. Circlator: Automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads[J]. Genome Biology, 2015, 16(1): 294-304.
- [23] SEEMANN T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation[J]. Bioinformatics, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [24] PAGE A J, CUMMINSET C A, HUNT M, et al. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis[J]. Bioinformatics, 2015, 31(22): 3691-3693.
- [25] 吴琼, 李伟程, 李敏, 等. *Limosilactobacillus fermentum* F-6 的遗传背景和功能基因组[J]. 微生物学报, 2021, 62(4): 1438-1451.
- WU Q, LI W C, LI M, et al. Genetic background and functional genome of *Limosilactobacillus fermentum* F-6[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 62(4): 1438-1451.
- [26] JAIN C, RODRIGUEZ-R L M, PHILLIPPY A M, et al. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 5114-5121.
- [27] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: An integrative Toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1-8.
- [28] ARBOLEYA S, BOTTACINI F, O'CONNELL - MOTHERWAY M, et al. Gene-trait matching across the *Bifidobacterium longum* pan-genome reveals considerable diversity in carbohydrate catabolism among human infant strains[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 33-49.
- [29] KANT R, RINTAHAKA J, YU X, et al. A comparative pan-genome perspective of niche-adaptable cell-surface protein phenotypes in *Lactobacillus rhamnosus*[J]. PLoS One, 2014, 9(7): 102762-102777.
- [30] 宋宇琴. 德氏乳杆菌保加利亚亚种的群体遗传学和功能基因组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- SONG Y Q. Study on population genetics and functional genomics of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [31] ARAHAL D R. Whole-genome analyses: Average nucleotide identity [J]. Methods in Microbiology, 2014, 12(41): 103-122.
- [32] CIUFO S, KANNAN S, SHARMA S, et al. Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68(7): 2386-2392.
- [33] NISSILA E, DOUILLARD F P, RITARI J, et al. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus rhamnosus* clinical isolates, their comparison with strain GG and their recognition by complement system[J]. PLoS One, 2017, 12(5): 0176739-0176742.
- [34] ARNOLD J W, SIMPSON J B, ROACH J, et al. Prebiotics for lactose intolerance: Variability in galacto-oligosaccharide utilization by intestinal *Lactobacillus rhamnosus* [J]. Nutrients, 2018, 10(10): 1-17.
- [35] 剧柠. 西藏, 新疆和云南地区传统发酵乳制品中乳杆菌的生物多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- JU N. Biodiversity of *Lactobacilli* from traditional fermented milk in Tibet, Xinjiang and Yunnan of China[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2009.
- [36] RUIZ L, GUEIMONDE M, COUTE Y, et al. Margolles, evaluation of the ability of *Bifidobacterium longum* to metabolize human intestinal mucus [J]. FEMS Microbiol Lett, 2011, 314(2): 125-130.
- [37] PENG C, WANG Y H, LIU F, et al. *FLOURY ENDOSPERM6* encodes a CBM48 domain-containing protein involved in compound granule formation and starch synthesis in rice endosperm[J]. The Plant Journal, 2014, 77(6): 917-930.
- [38] 杜元元, 郭小宇, 李鹤, 等. 一种新型黄原胶裂解酶的异源表达及酶学性质表征[J]. 食品工业科技, 2017, 38(2): 175-181.
- DU Y Y, GUO X Y, LI H, et al. Heterologous expression and characterization of a novel xanthan lyase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(2): 175-181.

- [39] NISHIO Y, NAKAMURA Y, USUDA Y, et al. Evolutionary process of amino acid biosynthesis in corynebacterium at the whole genome level[J]. *Narnia*, 2004, 21(9): 719–732.
- [40] PERAN L, CAMUESCO D, COMALAND M, et al. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis[J]. *International Journal of Colorectal Disease*, 2006, 21(8): 737–746.
- [41] KONIECZNA C, SŁODZIŃSKI M, SCHMIDT M T. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* KL 53A and *Lactobacillus casei* Fyos affect their adhesion to enterocytes[J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2018, 67(3): 273–281.
- [42] NOWAK B, ŚRÓTTEK M, CISZEK–LEND A M, et al. Exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KL37 inhibits T cell–dependent immune response in mice[J]. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2020, 68(3): 1–11.
- [43] CISZEK–LEND A M, NOWAK B, ŚRÓTTEK M, et al. Immunoregulatory potential of exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KL37. Effects on the production of inflammatory mediators by mouse macrophages[J]. *International Journal of Experimental Pathology*, 2011, 92(6): 382–391.

Reveal the Differences in the Genome of *Lactobacillus rhamnosus* Probio–M9 and Other *Lactobacillus rhamnosus* Based on Comparative Genomics

Xu Ruibo^{1,2,3}, Liu Xu^{1,2,3}, Li Weicheng^{1,2,3}, Shen Xin^{1,2,3}, Zhang Heping^{1,2,3*}

(¹Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018

²Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018

³Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

Abstract *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) is a symbiotic bacteria in the intestines of humans and animals and has applications in many fields, including food, medicine and animal farming. In this paper, the whole genome of *L. rhamnosus* Probio–M9 was used as the object to analyze the genome differences of different *Lactobacillus rhamnosus* combined with the 214 *L. rhamnosus* genome sequences published by NCBI. The results showed that a total of 16 915 pan-genes and 247 core genes were identified in 215 strains of *L. rhamnosus*; the subsequent phylogenetic trees were constructed using 247 core genes found that there was no obvious clustering trendx between the source and the place of separation. *L. rhamnosus* Probio–M9 was located in Branch II, which had the largest branch. The genetic relationship among strains of this branch was close, the difference was small, and the distinction was difficult. The RAST annotation and CAZy annotation analysis of 98 strains of *L. rhamnosus* in Branch II found that *L. rhamnosus* had a high degree of similarity in terms of function, but some of the strains were different from *L. rhamnosus* Probio–M9. Compared with other *L. rhamnosus*, *L. Rhamnosus* Probio–M9 had stronger ability to regulate its own metabolism, transcription, transportation and other aspects and contains genes related to probiotics, such as glutathione (*gshAB*), exopolysaccharides (RMLA–RMLD, *epsH*) and genes related to enhancing host metabolic capacity (*tagE*). The genomic differences of *L. rhamnosus* Probio M9 were revealed by comparative genomics, which laid the foundation for the development and application of *L. rhamnosus* Probio–M9.

Keywords *Lactobacillus rhamnosus* Probio–M9; *Lactobacillus rhamnosus*; comparative genomics